

# **PENENTUAN TIPE VIRUS EPSTEIN-BARR DALAM BIOPSI JARINGAN NASOFARING PENDERITA NON- KARSINOMA NASOFARING DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION**

TYPING OF EPSTEIN-BARR VIRUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION  
IN NASOPHARYNGEAL TISSUE BIOPSIES  
FROM NON-NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS

Nastiti Wijayanti<sup>1</sup>, Sofia Mubarika<sup>2</sup> dan R. Wasito<sup>3</sup>

Program Studi Bioteknologi  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

## **ABSTRACT**

Epstein-Barr Virus (EBV) is one of eight herpesvirus family members, commonly infected in humans. Infection EBV affects more than 90% of the human population in the world. EBV is a lymphotropic herpesvirus which also infects and replicates within oropharyngeal epithelial cells. The primary infection often occurs asymptotically and is followed by the establishment of a lifelong latent infection. EBV strains can be divided into two different types, i.e. types A and B on the basis of organization of their *Bam*HI-WYH and *Hind*III-E gen regions. The differences between these two types are located on sequence divergence within the *open reading frame* (ORF) encoding the nuclear antigen EBV (EBNA), i.e. EBNA2, EBNA3, EBNA4, and EBNA6. In general, typing of EBV infecting both NPC and asymptomatic patients in Indonesia, especially in the Special District of Yogyakarta (DIY) has not yet been studied. This work was focused on the presence of EBV type in non-NPC patients (asymptomatic) in DIY based on their gene differences of EBNA2. Biopsies of nasopharyngeal tissues obtained from Dr. Sardjito General Hospital were used as samples. QIMR-WIL cell lines and AG876 DNA were used as positive controls for types A and B, respectively. The deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from the biopsies of nasopharyngeal tissues was amplified with polymerase chain reaction (PCR) using a set of specific primers for types A (2A.1/2A.2) and B (2B.1/2B.2) of EBNA2 gene.

Amplification products of non-NPC samples indicated that types A and B were 6.5% and 62.5% respectively, both types (A and B) was 12.5% and the remaining of 18.75% were EBV negatif. The further study still needs to be done that will primarily be oriented to determine heterogeneity of other EBNA genes and EBV variant isolated from Yogyakarta area as well.

Key word: *Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA2), Type A and B Epstein-Barr virus.*

<sup>1)</sup> Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

<sup>2)</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

<sup>3)</sup> Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

## PENGANTAR

*Epstein-Barr Virus* (EBV) atau *Human herpesvirus 4* (HHV 4) adalah satu dari delapan *human herpesvirus* yang secara laten menginfeksi manusia. *Epstein-Barr Virus* merupakan virus DNA benang ganda dengan genom DNA  $\pm 172$  kbp (Baer *et al.*, 1984). Genom virus berbentuk linear sebagai partikel virus, tetapi ada bentuk lain berupa episom sirkular dalam nukleus sel yang terinfeksi (Baer *et al.*, 1984; Aitken *et al.*, 1994). Virus EBV terdapat dimana-mana dan menginfeksi lebih dari 90% populasi manusia sebagai infeksi asimtomatik (Young *et al.*, 1987; Aitken *et al.*, 1994). Semua isolat EBV dapat digolongkan sebagai tipe A atau B berdasarkan organisasi daerah gen *Bam*HI-WYH genom EBV. Perbedaan ini sebenarnya berasal dari perbedaan sekuen dalam *open reading frame* yang mengkode nuklear antigen 2 EBV (EBNA2) dan nuklear antigen 3, 4, dan 6 EBV (EBNA3, EBNA4 dan EBNA6) (Young *et al.*, 1987). Pada penelitian ini, tipe EBV diamati berdasarkan amplifikasi gen EBNA2. Kedua tipe EBV mempunyai perbedaan sekuen nukleotida gen EBNA2 sebesar 36% dan perbedaan asam amino sebesar 47% (Sample *et al.*, 1990). Distribusi geografis dua tipe virus itu berbeda, yaitu virus tipe A ditemukan di seluruh dunia, tetapi virus tipe B ditemukan secara dominan di Afrika Tengah dan New Guinea (Young *et al.*, 1987). EBV tipe A umumnya dominan dalam sirkulasi limfosit dan EBV tipe B menunjukkan tropisme pada sel-sel epitelia nasofaring, infeksi EBV tipe B ditemukan dalam limfosit pada kondisi tertentu (infeksi HIV atau imunosupresion yang diinduksi oleh obat) (Chen *et al.*, 1992; Kyaw *et al.*, 1992). Infeksi bersama EBV tipe A dan tipe B ditemukan pada individu Caucasian (Young *et al.*, 1987) dan terutama umum pada penderita imunosupresi, dengan individu mudah terpengaruh oleh superinfeksi yang lebih tinggi (Sculley *et al.*, 1989). Selain itu telah diketahui pula adanya rekombinan intertipik di antara ke-dua tipe EBV dengan diperolehnya hibrid dari suatu isolat EBV yang membawa tipe A pada bagian gen EBNA2 dan tipe B pada bagian gen EBNA3, EBNA4, dan EBNA6 (Sculley *et al.*, 1989; Burrows *et al.*, 1996).

Penelitian mengenai penentuan tipe EBV di Indonesia belum pernah dilakukan, sehingga belum diketahui tipe EBV yang umum berada dalam populasi di Indonesia pada umumnya dan di Daerah Istimewa Yogyakarta pada khususnya. Tujuan utama penelitian ini adalah untuk menentukan tipe *Epstein-Barr Virus* (EBV) pada penderita non-karsinoma nasofaring (non-NPC) di Daerah Istimewa Yogyakarta yang didasarkan pada perbedaan gen EBNA2.

## CARA PENELITIAN

**Sampel penelitian.** Sampel berupa biopsi jaringan nasofaring diperoleh dari pasien-pasien di Poliklinik Telinga Hidung Tenggorok (THT), Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito Yogyakarta. *Informed consent* dilakukan pada saat pasien akan dibiopsi untuk kepentingan diagnosa di bagian THT RSUP Dr. Sardjito. Sebanyak 16 biopsi jaringan nasofaring non-NPC (hasil diagnosa histopatologis) dikoleksi pada bulan Mei sampai dengan Juli 1999. QIMR-WIL *cell line* adalah LCL dengan EBV tipe A yang dikembangkan di Queensland Institute of Medical Research (QIMR), Brisbane-Australia, digunakan sebagai kontrol positif untuk EBV tipe A dan DNA dari AG876 *cell line* (prototipe EBV) digunakan sebagai kontrol positif untuk EBV tipe B.

**Kultur *cell line*.** QIMR-WIL *cell line* di kultur dalam medium kultur RPMI 1640 (mengandung 10% Fetal bovine serum dan antibiotik) dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C. Kultur sel ini dipelihara sampai *konfluen* atau bila medium telah berubah warna menjadi kuning, sel dapat dipanen untuk selanjutnya diisolasi DNA-nya.

**Isolasi DNA.** DNA genom diisolasi dari 16 biopsi jaringan nasofaring dan kultur sel. Prosedur isolasi DNA meliputi tahapan digesti jaringan atau sel, ekstraksi fenol dan presipitasi DNA. Prosedur isolasi DNA diambil dari Keller dan Manak (1990) dan Ausubel *et al.* (1996).

**Polymerase chain reaction (PCR).** Cetakan DNA yang digunakan adalah hasil isolasi dari biopsi jaringan nasofaring. Pada penelitian ini digunakan 2 pasang primer spesifik untuk menentukan tipe EBV, yaitu pasangan primer 2A.1/2A.2 dan 2B.1/2B.2 dengan sekuen sebagai berikut: (2A.1) 5' AACTTCAACCCACACCATCA 3'; (2A.2) 5' TTCTGGACTATCTGGATCAT 3'; (2B.1) 5' TACTCTTCCTC-AACCCAGAA 3'; (2B.2) 5' GGTGGTAGACTTAGTTGATG 3'. PCR dikerjakan dalam 25 µL volume yang mengandung 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% gelatin, 2 mM dNTP, masing-masing 10 pmol primer oligonukleotida dan  $\pm$  0,5 unit enzim *Tag* polimerase.

Satu tetes minyak mineral ditambahkan pada permukaan atas campuran PCR untuk menghindari hilangnya larutan karena penguapan selama proses amplifikasi berlangsung. DNA cetakan didenaturasi selama 5 menit pada 95°C dan diikuti dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi cetakan selama 15 detik pada 94°C, *annealing* primer selama 30 detik pada 56°C, *extension* selama 15 detik pada 72°C, dan diakhiri dengan 1 siklus *extra extension* selama 3 menit pada 72°C. Hasil amplifikasi diamati dengan elektroforesis pada gel

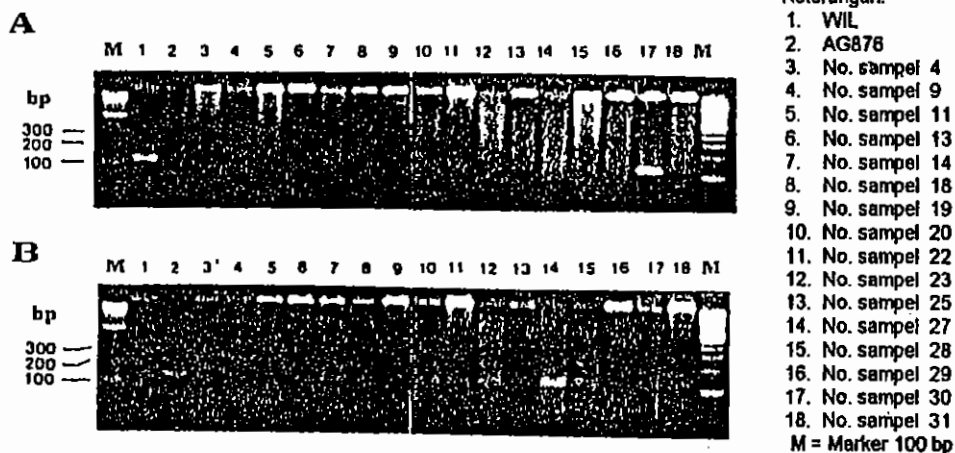
agarose 2,5% yang mengandung etidium bromida 0,5 µg/mL dalam bufer TBE 1X dan kuat arus 80 volt.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan 16 sampel yang berupa biopsi jaringan nasofaring, yang berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologis, ke-16 sampel itu adalah non-NPC. Aitken *et al.* (1994) menyatakan, bahwa primer yang dirancang untuk menunjukkan gen EBNA2 dapat digunakan untuk mengelompokkan *strain* EBV tipe A atau B. Primer itu dirancang untuk langsung mengamplifikasi daerah gen *Epstein-Barr Virus nuclear antigen 2* (EBNA2) yang menunjukkan urutan DNA yang berbeda di antara ke dua tipe EBV. Aitken *et al.* (1994) menyebutkan, produk PCR yang dihasilkan dari pasangan primer 2A.1/2A.2 pada B95-8 (prototipe EBV tipe A) adalah 116 bp dan produk PCR dari pasangan primer 2B.1/2B.2 pada AG876 (prototipe EBV tipe B) adalah 120 bp. Pada penelitian ini QIMR-WIL *cell line* yang memiliki sekuen sama dengan B95-8 digunakan sebagai kontrol positif EBV tipe A. Gambar 1 menunjukkan produk PCR sampel non-NPC. Gambar 1.A adalah produk amplifikasi pasangan primer 2A.1/2A.2 dan Gambar 1.B adalah produk amplifikasi pasangan primer 2B.1/2B.2. Kontrol positif EBV tipe A (QIMR-WIL) yang berupa produk amplifikasi gen EBNA2A terlihat pada Gambar 1A *lane* 1, sementara QIMR-WIL menjadi kontrol negatif pada penggunaan pasangan primer 2B.1/2B.2 dengan tidak terdapatnya produk amplifikasi gen EBNA2B (Gambar 1B *lane* 1). Kontrol positif EBV tipe B (AG876) yang berupa produk amplifikasi gen EBNA2B terlihat pada Gambar 1B *lane* 2, sementara AG876 menjadi kontrol negatif pada penggunaan pasangan primer 2A.1/2A.2 dengan tidak terdapatnya produk amplifikasi gen EBNA2A (Gambar 1A *lane* 2).

Produk PCR 16 sampel biopsi penderita non-NPC dengan pasangan primer 2A.1/2A.2 dan 2B.1/2B.2 memperlihatkan sampel 30 (*lane* 17 Gambar 1.A) menunjukkan keberadaan EBV tipe A dengan adanya fragmen 116 bp yang mirip dengan kontrol EBV tipe A (*lane* 1 Gambar 1.A). Sampel 9, 11, 13, 18, 19, 20, 23, 25, 27 dan 28 (*lane* 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 dan 15 pada Gambar 1.B) menunjukkan keberadaan EBV tipe B dengan adanya fragmen 120 bp yang mirip dengan kontrol EBV tipe B (*lane* 2 Gambar 1.B), sedangkan sampel 14 dan 22 menunjukkan keberadaan EBV tipe campuran (tipe A dan B) dengan terdapatnya hasil amplifikasi dengan primer untuk tipe A (*lane* 7 dan 11 Gambar 1.A) dan juga tipe B (*lane* 7 dan 11 Gambar 1.B) dan sampel 4, 29, dan 31 adalah EBV negatif dengan tidak terdapatnya produk amplifikasi PCR dengan pasangan primer 2A.1/2A.2 (*lane* 3, 16, dan 18 Gambar 1.A) dan

2B.1/2B.2 (lane 3, 16 dan 18 Gambar 1.B). Hasil PCR 16 sampel biopsi non-NPC menunjukkan keberadaan EBV tipe A: 6,25% (1/16), tipe B: 62,5% (10/16) dan tipe campuran: 12,5% (2/16). Sisa sampel 18,75% (3/16) menunjukkan negatif EBV (Tabel 1). Populasi sampel penelitian menunjukkan 81,25% (13/16) positif EBV. Tabel 2 menunjukkan persentase EBV positif pada sampel penelitian. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa EBV terdapat pada populasi penderita non-NPC. Hal ini mungkin karena penderita non-NPC adalah penderita asimtomatik.



Gambar 1.A dan B. Gambaran elektroforesis pada agarose 2,5%, hasil PCR menggunakan primer komplementer untuk daerah gen EBNA2A (A) dan EBNA2B (B) pada sampel biopsi penderita non-NPC. Kontrol positif tipe A (WIL) 116 bp (lane 1.A) dan kontrol positif tipe B (AG876) 120 bp (lane 2.B).

**Tabel 1. Hasil penentuan tipe EBV menggunakan PCR pada penderita non-NPC**

No. sampel	Produk amplifikasi primer		Determinasi sebagai EBV				Total
	2A.1/2A.2	2B.1/2B.2	tipe A	tipe B	tipe A & B	negatif	
4	-	-				✓	
9	-	+		✓			
11	-	+		✓			
13	-	+		✓			
14	+	+			✓		
18	-	+		✓			
19	-	+		✓			
20	-	+		✓			
22	+	+			✓		
23	-	+		✓			
25	-	+		✓			
27	-	+		✓			
28	-	+		✓			
29	-	-				✓	
30	+	-	✓				
31	-	-				✓	
Jumlah sampel			1	10	2	3	16
Persentase (%)			6,25	62,5	12,5	18,75	100

Tipe EBV yang ditemukan pada penelitian ini sangat berbeda dari data yang ada sebelumnya. Bouzid *et al.* (1994) menyatakan, bahwa penyebaran EBV tipe A umumnya meliputi daerah Cina bagian Selatan, Malaysia, dan Caucasian, dan Young *et al.* (1987) menyatakan, bahwa EBV tipe B umum ditemukan pada individu sehat di Afrika dan New Guinea. Pada penelitian ini ditemukan mayoritas EBV tipe B pada penderita non-NPC sedangkan berdasarkan teori tersebut di atas, distribusi geografi EBV di Indonesia adalah EBV tipe A. Sekalipun terdapat perbedaan penyebarannya, tetapi hasil penelitian ini sesuai dengan teori yang menyatakan, bahwa EBV tipe B menunjukkan tropisme pada sel-sel epitelia nasofaring (Chen *et al.*, 1992; Kyaw *et al.*, 1992). Adanya perbedaan antara hasil penelitian ini dengan penelitian-penelitian lain seperti yang telah disebutkan di atas, perlu diuji lebih lanjut, misalnya dengan uji hibridisasi menggunakan pelacak tipe spesifik, penggunaan primer bagian gen EBNA2 yang lain, atau dengan menggunakan gen EBNA yang lain.

**Tabel 2. Persentase EBV positif pada penderita non-NPC**

Type EBV Sampel	Type A (%)	Type B (%)	Type A & B (%)	Negatif (%)	Jumlah sampel
non-NPC	6,25 (1)	62,5 (10)	12,5 (2)	18,75 (3)	16
Positif EBV	81,25				

## KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

1. Dengan metode PCR, didapatkan 3 (tiga) tipe EBV pada penderita non-NPC di DIY, yaitu: EBV tipe A, B, dan campuran (A dan B bersama-sama dalam satu sampel).

2. Enam belas (16) sampel biopsi nasofaring penderita non-NPC menunjukkan keberadaan EBV tipe A: 6,25% (1/16), tipe B: 62,5% (10/16), tipe campuran: 12,5% (2/16), dan EBV negatif: 18,75% (3/16). Persentase keberadaan EBV pada sampel penelitian adalah 81,25%.

### B. Saran

Penelitian lanjutan menggunakan *Southern blot* diperlukan untuk mempertegas hasil penentuan tipe EBV dengan PCR, mengingat, bahwa tipe EBV dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan pendekatan pembuatan jenis vaksin.

### Ucapan terimakasih

Terimakasih ingin penulis sampaikan kepada yang terhormat Ibu Dr. Sukarti Moeljopawiro, M.App.Sc. yang telah sangat memperlancar jalannya penelitian ini dengan pemberian *Tag* polimerase-nya. Prof. Dennis Moss dan Dr. Norbert Kienzell dari QIMR-Brisbane, Australia, yang telah memberikan QIMR-WIL *cell line* dan DNA AG876.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, C., Sengupta, S.K., Aedes, C., Moss, D.J. and Scully, T.B. 1994. Heterogeneity within The Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 Gene in Different Strain of Epstein-Barr Virus. *J. Gen. Virol.* 75: 95-100.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 1-3. John Wiley and Sons Inc. United States of America.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Sequin, C., Tuffnell, P.S. and Barrel, B.G. 1984. DNA Sequence and Expression of The B95-8 Epstein-Barr Virus Genome. *Nature*. 310: 207-211.

- Bouزيد, M., Djennaoui, D., Dubreuil, J., Bouguermouh, A., Ellouz, D., Abdelwahab, J., Decaussin, G. and Ooka, T. 1994. Epstein-Barr Virus Genotypes in NPC Biopsies from North Africa. *Int. J. Cancer*. 56: 468-473.
- Burrows, J.M., Khanna, R., Sculley, T.B., Alpers, M.P., Moss, D.J. and Burrows, S.R. 1996. Identification of a Naturally Occurring Recombinant Epstein-Barr Virus Isolate from New Guinea That Encodes both Type 1 and Type 2 Nuclear Antigen Sequences. *J. Virol.* 70.7: 4829-4833
- Chen, X., Pepper, S.V. and Arrand, J.R. 1992. Prevalence of A and B Types of Epstein-Barr Virus DNA in Nasopharyngeal Carcinoma Biopsies from Southern China. *J. Gen. Virol.* 73: 463-466.
- Keller, G.H. and Manak, M.M. 1990. *DNA Probes*. Stockton press. New York.
- Kyaw, M.T., Hurren, L., Evans, L., Moss, D.J., Cooper, D.A., Benson, E., Esmore, D. and Sculley, T.B. 1992. Expression of B Type Epstein-Barr Virus in HIV- Infected Patients and Cardiac Transplant Recipients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 8.11: 1869-1874
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E. and Rickinson, A. 1990. Epstein-Barr Virus Types 1 and 2 Differ in Their EBNA-3A, EBNA-3B and EBNA-3C Genes. *J. Virol.* 64: 4084-4092.
- Sculley, T.B., Apolloni, A., Stumm, R., Moss, D.J., Mueller-Lantczh, N., Misko, I. S. and Cooper, D.A. 1989. Expression of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigens 3, 4, and 6 Are Altered in Cell Lines Containing B-Type Virus. *Virology*. 171: 401-408.
- Young, L.S., Yao, Q.Y., Rooney, C.M., Sculley, T.B., Moss, D.J., Rupani, H., Laux, G., Bomkamm, G.W. and Rickinson, A.B. 1987. New Type B Isolates of Epstein-Barr Virus from Burkitt's Lymphoma and from Normal Individuals in Endemic Areas. *J. Gen. Virol.* 68: 2853-2862.